

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

23.06.00

JP00/4146

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年10月 5日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第284075号

出 願 人

Applicant(s):

帝人株式会社

REC'D 11 AUG 2000

WIPO

PCT

PRIORITY

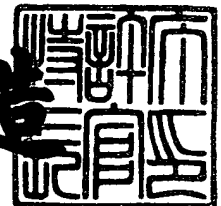
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058522

【書類名】 特許願

【整理番号】 P32816

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成11年10月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/59

【発明の名称】 破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法

【請求項の数】 6

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東  
京研究センター内

        【氏名】 東 由明

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東  
京研究センター内

        【氏名】 太田 知裕

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東  
京研究センター内

        【氏名】 小森谷 恵司

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都国立市西1丁目15番20号

        【氏名】 工藤 明

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県大和市下鶴間2129-3 ライオンズマンシ  
ョンつきみ野2-904号

        【氏名】 竹下 淳

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市緑区長津田4丁目9番6号 ホドガヤビル108号

【氏名】 梶 圭介

【特許出願人】

【識別番号】 000003001

【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代表者】 安居 祥策

【代理人】

【識別番号】 100077263

【弁理士】

【氏名又は名称】 前田 純博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010250

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 新規性の喪失の例外証明書 1

【提出物件の特記事項】 追って補充する。

【包括委任状番号】 9701951

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【請求項 2】 該誘導因子類が、マクロファージコロニー刺激因子、破骨細胞形成因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-4、血管内皮細胞増殖因子から選ばれる少なくとも一種である請求項 1 記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【請求項 3】 培養液中に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【請求項 4】 該共存培養系に含まれる細胞が、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞から選ばれる少なくとも一種である請求項 3 記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【請求項 5】 該共存培養系の培養液中に誘導因子類を含む請求項 3 または 4 記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【請求項 6】 該誘導因子類が、マクロファージコロニー刺激因子、破骨細胞形成因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン-1、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-11、インターロイキン-15、インターロイキン-17、プロスタグランジン類、副甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、血管内皮細胞増殖因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、活性型ビタミンD類から選ばれる少なくとも一種である請求項 5 記載の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法に関するものであり、超音波（以下「US」ということがある。）を照射することを特徴とする破骨細胞

胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法である。

【0002】

【従来技術】

従来、破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法としては、たとえば、共存培養系にビスホスホネート類を添加する方法等が知られていた [Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA eds. Principales of bone biology Academic Press, New York (1996)]。臨床的には、破骨細胞形成または骨吸収を抑制する医薬品が、破骨細胞による骨吸収に基づく骨関連疾患治療に使われていた [Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA eds. Principales of bone biology Academic Press, New York (1996)]。しかしながら、これら薬剤あるいは医薬品を添加あるいは投与する方法は、体内あるいは細胞内に直接取り込まれ、常に副作用の危険を伴うことが問題とされていた。従って、このような副作用の危険性の少ない破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らはこのような副作用の危険性の少ない破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法をみいだすべく鋭意研究を行ったところ、物理的・非侵襲的な超音波刺激により、破骨細胞形成または骨吸収を抑制することができることを見出し本発明に到達した。

【0004】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法、または、培養液中に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法である。

【0005】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で用いられる破骨細胞前駆細胞としては、培養液中に含まれる誘導因子

類によって破骨細胞が形成されるもの、または培養液中において他の破骨細胞形成支持能を有する支持細胞と共存せしめることにより破骨細胞が形成されるものである。この破骨細胞前駆細胞としては、骨髓由来前駆細胞、脾臓由来前駆細胞、末梢血単球由来前駆細胞等が挙げられる。該細胞は、ヒト、マウス等の骨髓、脾臓、もしくは末梢血より入手可能であり、破骨細胞前駆細胞培養用の培地を用いて培養、継代して得ることができる。

#### 【0006】

ここで、破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞を形成せしめる誘導因子類としては、マクロファージコロニー刺激因子（以下「M-CSF」という。）、破骨細胞形成因子（RANKL/TRANCE/ODF/OPGL、以下「RANKL」という。）、腫瘍壊死因子（以下「TNF」という。）インターロイキン-4（IL-4）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）から選ばれる少なくとも一種であり、これらは一種のみ用いてもいいし、数種類用いてもよい。この中でもRANKLを用いることが好ましく、特に人工的に作製された可溶性のRANKLを、濃度1~250ng/mlで用いることが好ましい。これら、誘導因子類の培養液への添加時期は、破骨細胞前駆細胞を播き込んだ直後から、破骨細胞が形成されるまでである。

#### 【0007】

共存培養系に含まれる破骨細胞前駆細胞以外の細胞としては、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞から選ばれる少なくとも一種を挙げることができ、これらは一種のみ用いてもいいし、数種類用いてもよい。

#### 【0008】

更に、該共存培養系の培養液中に、誘導因子類を含むことが好ましい。ここで用いられる該誘導因子類としては、前記M-CSF、RANKL、TNF、IL-4、VEGFの他にインターロイキン-1（以下「IL-1」という。）、インターロイキン-3（以下「IL-3」という。）、インターロイキン-6（以下「IL-6」という。）、インターロイキン-11（以下「IL-11」という。）、インターロイキン-15（以下「IL-15」という。）、インターロイキン-17（以下「IL-17」という。）、プロスタグランジンE2等のプロスタグランジン類（以下「PG」という。）、副甲状腺ホルモン（以下「PTH」という。）、副甲状腺ホルモン関連ペプチド（以下

「PTHrP」という。）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（以下「GM-CSF」という。）、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>等の活性型ビタミンD類（以下「VD」という。）を挙げることができ、これらから選ばれる少なくとも一種もしくは数種類を用いることができる。

【0009】

上記誘導因子類の中では、RANKLを用いることが特に好ましい。これは、RANKLが生体内における破骨細胞形成に必須の因子であり、骨の代謝・維持に重要な役割を果たしている [Takahashi N, et al. Biochem Biophys Res Comm 256: 449-455 (1999)] からである。RANKLは、生体内では破骨細胞形成を支持する細胞、例えば骨芽細胞、ストロマ細胞、線維芽細胞等の細胞表面に存在し、破骨細胞前駆細胞が有する受容体（RANK/TRANCE/ODFR）と結合することによって、破骨細胞形成を誘導する [Takahashi N, et al. Biochem Biophys Res Comm 256: 449-455 (1999)]。生体内では、RANKLは可溶性因子としては存在していないことから、共存培養による破骨細胞形成系は、生体内の環境により近い評価システムであると考えられる。RANKLは、正常下での骨代謝に重要な役割を果たしているが、骨関連疾患とも深く関わっている。例えば閉経後骨粗鬆症においては、破骨細胞の数と骨吸収活性が増加し骨量が減少するが、この時の破骨細胞の形成にはRANKLの増加が関与していると考えられている [Kong YY, et al. Nature 397: 315-323 (1999)]。RANKLとRANKLの結合を妨げる生体内分子である破骨細胞形成抑制因子（以下「OPG/OCIF」という。）は、RANKLによって誘導される破骨細胞の形成を誘導するとともに、破骨細胞の形成亢進・破骨細胞の活性亢進に基づく骨関連疾患の動物モデルにおいて、例えば高カルシウム血症モデル、骨粗鬆症モデルにおいて、破骨細胞の形成を抑制し、骨吸収活性を抑制することによって、骨量低下や血清カルシウム濃度の増加といった症状を改善することが明らかになっている [Lacey DL, et al. Cell 93: 165-176 (1998)]。このように、RANKLあるいはRANKLを誘導するような因子が関与することによって生ずる破骨細胞形成促進、ならびに骨吸収促進が関与すると考えられている骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨量減少または骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、骨転移した腫瘍による骨破壊などに対して、RANKLに

よる破骨細胞誘導あるいは骨吸収亢進の抑制は、該骨関連疾患の治療法として応用が期待される。

#### 【0010】

本発明における共存培養系とは、破骨細胞前駆細胞と少なくとも一種の破骨細胞形成支持能を有する細胞とを同じ培地内で培養する方法をいう。ここで、破骨細胞形成支持能を有する細胞としては、骨芽細胞、ストローマ細胞、線維芽細胞、T細胞、B細胞から選ばれる少なくとも一種を挙げることができ、これらは一種のみ用いてもよいし、数種類用いてもよい。この中でストローマ細胞を用いることが好ましく、更に骨髓由来ストローマ細胞を用いることが好ましい。破骨細胞前駆細胞との組み合わせとしては、骨髓由来の破骨細胞前駆細胞と骨髓由来のストローマ細胞とを組み合わせることが最も好ましい。骨髓由来ストローマ細胞としては、マウス骨髓ストローマ細胞として、ST-2、TSB-13-9等が挙げられる。該ST-2の入手方法としては、アメリカンタイプカルチャーコレクションより入手可能であり、以下に詳述する培地により培養、継代して実験に供することができ

#### 【0011】

本発明で用いられる破骨細胞前駆細胞培養用の培養液としては、8~1000ng/mlのM-CSFを含み、5%~15%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地等が挙げられる。なかでも、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いることが好ましい。

#### 【0012】

共存培養系で用いられる培養液としては、前記誘導因子類、5%~15%ウシ胎児血清等を添加したアルファMEM培地等が挙げられ、特に、 $1 \times 10^{-10} \text{M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲の $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3と10%ウシ胎児血清とを添加したアルファMEM培地を用いることが好ましい。これら誘導因子類を培地に添加する時期としては、破骨細胞前駆細胞と骨髓由来ストローマ細胞等の破骨細胞形成支持能を有する細胞とを同時に巻き込み、破骨細胞が形成されるまで添加することができる。

#### 【0013】



本発明で照射される超音波とは、熱を発生しないような低出力の超音波をいう。具体的には、周波数1.3～2MHz、繰り返し周波数100～1000kHz、パルス幅10～2000 $\mu$ sec、出力100mW/cm<sup>2</sup>以下の低出力超音波である。該超音波の照射方法としては、例えば、1日20分間低出力超音波パルスをExogen社の超音波出力ユニットを用いて、培養ウエルの底面へ伝わるようにし、連続3日～5日間照射する。照射条件としては、例えば、超音波出力の特性としてパルス幅200 $\mu$ sec、周波数1.5MHz、1kHzの繰り返し周波数、出力30mW/cm<sup>2</sup>で行うことが好ましい。

## 【0014】

本発明の超音波を照射するための超音波発生装置としては特に規定はないが、例えば、臨床応用する場合等には、Duarteの米国特許（No.4,530,360）に記載されているような患部に近接した体外より経皮的に超音波のパルスを適用することができる基礎的な非侵襲的治療装置等を用いることができる。その装置から発生される超音波は、周波数1.3～2MHz、繰り返し周期100～1,000Hz、パルス幅10～2000 $\mu$ sec、出力100mW/cm<sup>2</sup>以下の低出力超音波である。また、その照射時期は1日20分以内とすることが好ましい。また、Talish他の米国特許（No. 5,003,965）によって遠隔制御ユニットに接続されたボディ・アプリーケーター・ユニットを有する超音波体治療システムを用いることができる。この場合の超音波は、周波数1.3～2MHz、出力1～50mW/cm<sup>2</sup>の低出力超音波である。

## 【0015】

本発明の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法を応用し、超音波を、破骨細胞形成もしくは骨吸収亢進に基づく骨減少または骨破壊が起こっている患部に照射することにより、骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨量減少もしくは骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、骨転移した腫瘍による骨破壊等の治療に向けての臨床応用が可能となる。更に、本発明の破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法は、従来問題となっていた薬剤等の投与による副作用の危険性が少ないものであり、今後の臨床応用が期待される。

## 【0016】

## 【発明の実施の形態】

以下、実施例を挙げて本発明を説明する。

【0017】

〔実施例1-1～1-4および比較例1-1～1-4〕

マウス骨髄由来破骨細胞前駆細胞（以下「MDBM」という。）は、マウスの大腿骨および脛骨の骨髄を採取した後、常法により単球成分のみを分離し、 $4 \times 10^6$ 個/10cm-dishに播き込んで接着性細胞のみを100 ng/mlのM-CSF存在下で3日間培養することにより得た。培地には、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。MDBMを $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で6穴ウエルに2mlの量で播いた。ここに、可溶性RANKL（以下「sRANKL」という。）を50ng/mlになるように添加した。sRANKLは、Pepro-Tech社より入手したものをを用いた。実験は以下の群を設定した。

【0018】

比較例1-1； 対照群（コントロール）の72時間培養群

実施例1-1； 超音波照射群の72時間培養群

超音波を1日20分間、連続2日間ウエルの底面より照射した。

比較例1-2； 対照群（コントロール）の96時間培養群

実施例1-2； 超音波照射群の96時間培養群

超音波を1日20分間、連続3日間ウエルの底面より照射した。

比較例1-3； 対照群（コントロール）の108時間培養群

実施例1-3； 超音波照射群の108時間培養群

超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

比較例1-4； 対照群（コントロール）の144時間培養群

実施例1-4； 超音波照射群の144時間培養群

超音波を1日20分間、連続5日間ウエルの底面より照射した。

【0019】

sRANKLの添加に関しては、比較例および実施例ともに、滅菌蒸留水で $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解したものを、200倍希釈で50ng/mlになるように添加した。3日目に比較例および実施例ともに50ng/mlのsRANKLを含んだ新鮮な10%FCS- $\alpha$  MEMに交換

した。

#### 【0020】

超音波の照射に関しては、比較例1-1～1-4では、超音波は照射せず、実施例1-1～1-3では1日20分間低出力超音波パルス、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものを用いて、ウェル底面より実施例1-1では連続2日間、実施例1-2では連続3日間、実施例1-3では連続4日間、実施例1-4では連続5日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅200  $\mu$  sec、超音波周波数1.5 MHz、1 kHzの繰り返し周波数、出力30mW/cm<sup>2</sup>で行った。

#### 【0021】

比較例1-1および実施例1-1では培養開始72時間後、比較例1-2および実施例1-2では培養開始96時間後、比較例1-3および実施例1-3では培養開始108時間後、比較例1-4および実施例1-4では培養開始144時間後に培地を除去し、細胞をリン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に従って破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、光学顕微鏡下で、10核以上の細胞核を有するTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として、その数を測定した。

#### 【0022】

結果を図1に記載した。図1から明らかな通り、実施例1-2～1-4における破骨細胞数は、比較例1-2～1-4に比べて減少している。

#### 【0023】

##### [実施例2-1～2-2および比較例2-1～2-2]

MDBMは、マウスの大腿骨および脛骨の骨髓を採取した後、常法により単球成分のみを分離し、4×10<sup>6</sup>個/10cm-dishに播き込んで接着性細胞のみを100 ng/mlのM-CSF存在下で3日間培養することにより得た。培地には、100ng/mlのM-CSFを含み、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。マウス骨髓由来ストローマ細胞株TSB-13-9は、SV-40-large-T-antigen transgenic miceの骨髓より樹立した細胞株である。TSB-13-9は、2×10<sup>5</sup> 個/10cm-dishに播き込んで3日間培養したものを使用した。培地には、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を

用いた。

【0024】

MDBMは $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で、TSB-13-9は $1 \times 10^6$ 個/wellの密度で、同時に6穴ウエルに2mlの量で播いた。ここに、 $1 \times 10^{-8}$ Mの $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3を添加した。実験は以下の群を設定した。

【0025】

比較例2-1； 対照群（コントロール）の96時間培養群

実施例2-1； 超音波照射群の96時間培養群

超音波を1日20分間、連続3日間ウエルの底面より照射した。

比較例2-2； 対照群（コントロール）の120時間培養群

実施例2-2； 超音波照射群の120時間培養群

超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

【0026】

$1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3の添加に関しては、比較例および実施例ともに、エタノールで $1 \times 10^{-5}$ Mの濃度に溶解したものを、1000倍希釈で $1 \times 10^{-8}$ Mになるように添加した。3日目に比較例および実施例ともに $1 \times 10^{-8}$ Mの $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD3を含んだ新鮮な10%FCS- $\alpha$  MEMに交換した。

【0027】

超音波の照射に関しては、比較例1-1～1-2では、超音波は照射せず、実施例1-1～1-2では1日20分間低出力超音波パルスを用いて、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものをを用いて、ウエル底面より実施例1-1では連続3日間照射し、実施例1-2では連続4日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅200  $\mu$ sec、超音波周波数1.5 MHz、1 kHzの繰り返し周波数、出力30 mW/cm<sup>2</sup>で行った。

【0028】

比較例1-1および実施例1-1では培養開始96時間後、比較例1-2および実施例1-2では培養開始120時間後に培地を除去し、細胞を10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に従って破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（以下「TRAP」という。）染色を行い、光学顕微鏡下で、10核以上の

細胞核を有するTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として、その数を測定した。結果を図1に記載した。

#### 【0029】

図2および図3から明らかな通り、実施例1-1～1-2における破骨細胞数は、比較例1-1～1-2に比べて減少している。

#### 【0030】

##### 〔実施例3-1および比較例3-1〕

実施例1と同様の方法で調製したMDBMを $2 \times 10^4$ 個/wellの密度で24穴ウエルに1 mlの量で播いた。24穴ウエルには、あらかじめ骨吸収活性測定用のハイドロキシアパタイトコーティングディスク (Osteologic, Millennium Biologix, Inc.) を入れておき、この上に細胞が生着するようにした。sRANKLを50 ng/mlになるように添加した。sRANKLは、Pepro-Tech社より入手したものをを用いた。

#### 【0031】

実験は以下の群を設定した。

比較例3-1； 対照群（コントロール）の120時間培養群

実施例3-1； 超音波照射群の120時間培養群

超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

#### 【0032】

sRANKLの添加に関しては、比較例および実施例ともに、滅菌蒸留水で $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解したものを、200倍希釈で50ng/mlになるように添加した。3日目に比較例および実施例ともに50ng/mlのsRANKLを含んだ新鮮な10%FCS- $\alpha$  MEMに交換した。

#### 【0033】

超音波の照射に関しては、比較例3-1では、超音波は照射せず、実施例3-1では1日20分間低出力超音波パルス、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものをを用いて、ウエル底面より実施例3-1では連続4日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅 $200 \mu\text{sec}$ 、超音波周波数1.5 MHz、1 kHzの繰り返し周波数、出力 $30 \text{ mW/cm}^2$ で行った。

【0034】

比較例3-1および実施例3-1では培養開始120時間後に培地を除去し、ハイドロキシアパタイトコーティングディスクを取り出した。蒸留水で洗浄後、光学顕微鏡下で破骨細胞によるハイドロキシアパタイトの溶解状態を観察した。ディスクの一部（全体面積の50%以上）を画像取り込み装置によりコンピュータに取り込み、溶解された面積を画像解析ソフトを用いて測定し、全体面積あたりの溶解された面積を計算し、破骨細胞による骨吸収面積として図3に記載した。

【0035】

図3から明らかな通り、実施例3-1における破骨細胞による骨吸収面積は、比較例3-1に比べて減少している。

【0036】

〔実施例4-1および比較例4-1〕

実施例2と同様の方法で、MDBMとマウス骨髄由来ストローマ細胞株TSB-13-9を準備した。培地には、10%ウシ胎児血清を添加したアルファMEM培地を用いた。

【0037】

MDBMは $2 \times 10^4$ 個/wellの密度で、TSB-13-9は $1 \times 10^5$ 個/wellの密度で、24穴ウエルに同時に播いた。培地量は最終的に1mlに調整した。24穴ウエルには、あらかじめ骨吸収活性測定用のハイドロキシアパタイトコーティングディスク (osteologic, Millennium Biologix, Inc.)を入れておき、この上に細胞が生着するようにした。ここに、最終濃度 $1 \times 10^{-8}$ Mとなるように $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン $D_3$ を添加した。

【0038】

実験は以下の群を設定した。

比較例4-1； 対照群（コントロール）の120時間培養群

実施例4-1； 超音波照射群の120時間培養群

超音波を1日20分間、連続4日間ウエルの底面より照射した。

【0039】

$1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン $D_3$ の添加に関しては、比較例および実施例とも

に、エタノールで $1 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度に溶解したものを、1000倍希釈で $1 \times 10^{-8} \text{M}$ になるように添加した。3日目に比較例および実施例ともに $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の $1\alpha, 25\text{-ジヒドロキシビタミンD}_3$ を含んだ新鮮な10% FCS- $\alpha$  MEMに交換した。

#### 【0040】

超音波の照射に関しては、比較例4-1では、超音波は照射せず、実施例4-1では1日20分間低出力超音波パルスを、Exogen社の超音波出力ユニットを細胞照射用に改変したものを用いて、ウェル底面より実施例4-1では連続4日間照射した。ここで、超音波の出力特性は、バースト幅 $200 \mu\text{sec}$ 、超音波周波数 $1.5 \text{ MHz}$ 、 $1 \text{ kHz}$ の繰り返し周波数、出力 $30 \text{ mW/cm}^2$ で行った。

#### 【0041】

比較例4-1および実施例4-1では培養開始120時間後に培地を除去し、ハイドロキシアパタイトコーティングディスクを取り出した。蒸留水で洗浄後、光学顕微鏡下で破骨細胞によるハイドロキシアパタイトの溶解状態を観察した。ディスクの一部（全体面積の50%以上）を画像取り込み装置によりコンピュータに取り込み、溶解された面積を画像解析ソフトを用いて測定した。全体面積あたりの溶解された面積を計算し、破骨細胞による骨吸収面積として図4に記載した。

#### 【0042】

図4から明らかな通り、実施例4-1における破骨細胞による骨吸収面積は、比較例4-1に比べて減少している。

#### 【0043】

#### 【発明の効果】

本発明は、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成または骨吸収の抑制方法であり、このような物理的・非侵襲的な超音波を、破骨細胞形成もしくは骨吸収亢進に基づく骨減少または骨破壊が起こっている患部に照射することにより、副作用の危険性がなく、骨関連疾患、例えば骨粗鬆症、慢性関節リウマチの骨量減少もしくは骨破壊、人工関節置換術直後の骨減少、人工関節置換術後のルーズニング、骨転移した腫瘍による骨破壊等の治療に向けての臨床応用が可能となる。更に、本発明の破骨細胞形成または骨吸収の抑制方法は、従来問題となっていた薬剤等の投与による副作用の危険性が少ないものであり、今後の臨床応用

が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、マウス破骨細胞前駆細胞から sRANKL によって形成された破骨細胞数を示したものであり、破骨細胞数の経時変化を示したものである。

【図 2】

図 2 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株との共存培養によって形成された 9 6 時間後の破骨細胞数を示したものである。

【図 3】

図 3 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株との共存培養によって形成された 1 2 0 時間後の破骨細胞数を示したものである。

【図 4】

図 4 は、マウス破骨細胞前駆細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株との共存培養によって形成された破骨細胞による骨吸収面積を示したものである。

【符号の説明】

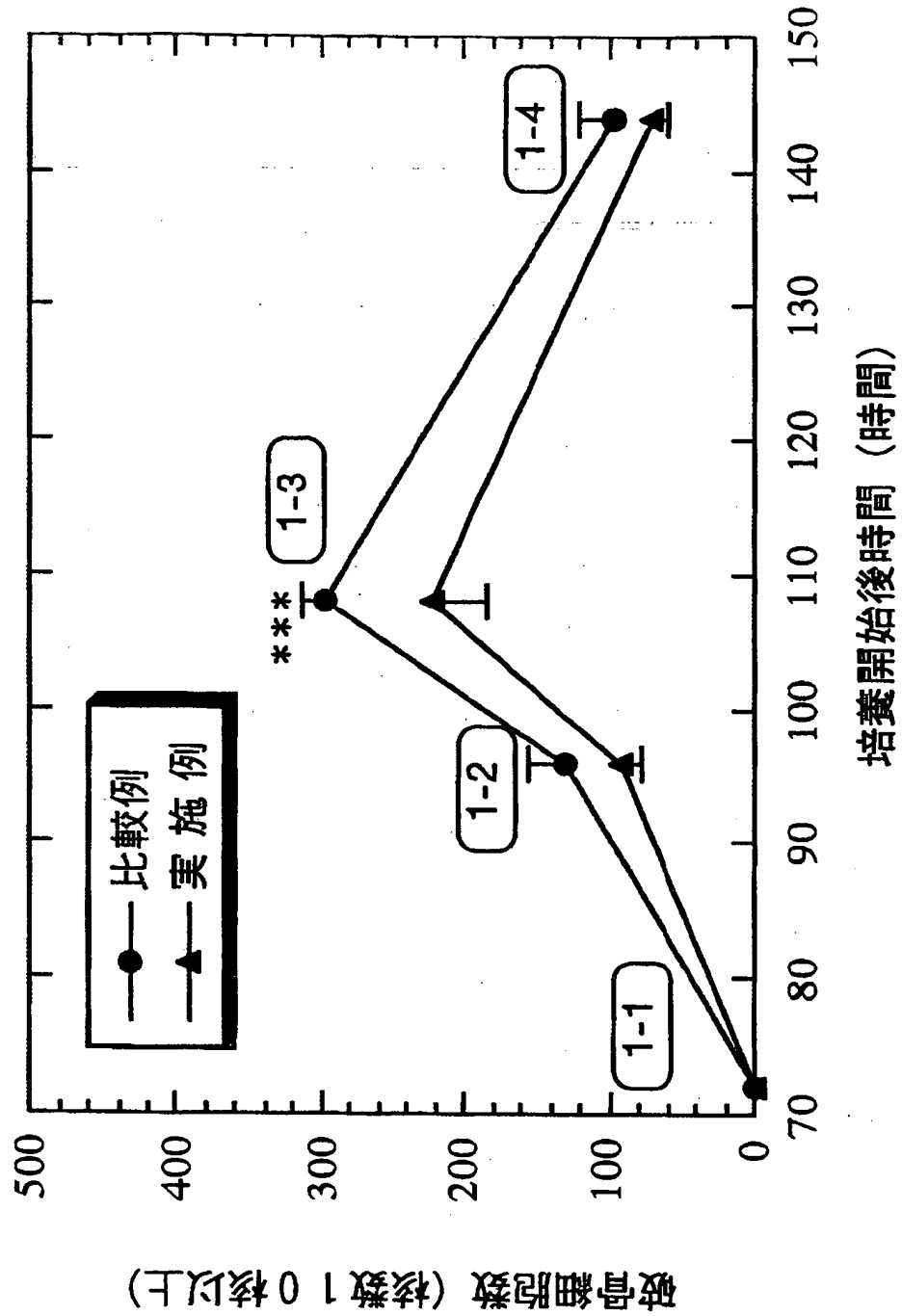
\*は Student's t 検定の結果、対照群に対して、 $p < 0.05$ であることを表す。

\*\*\*は Student's t 検定の結果、対照群に対して、 $p < 0.001$ であることを表す。

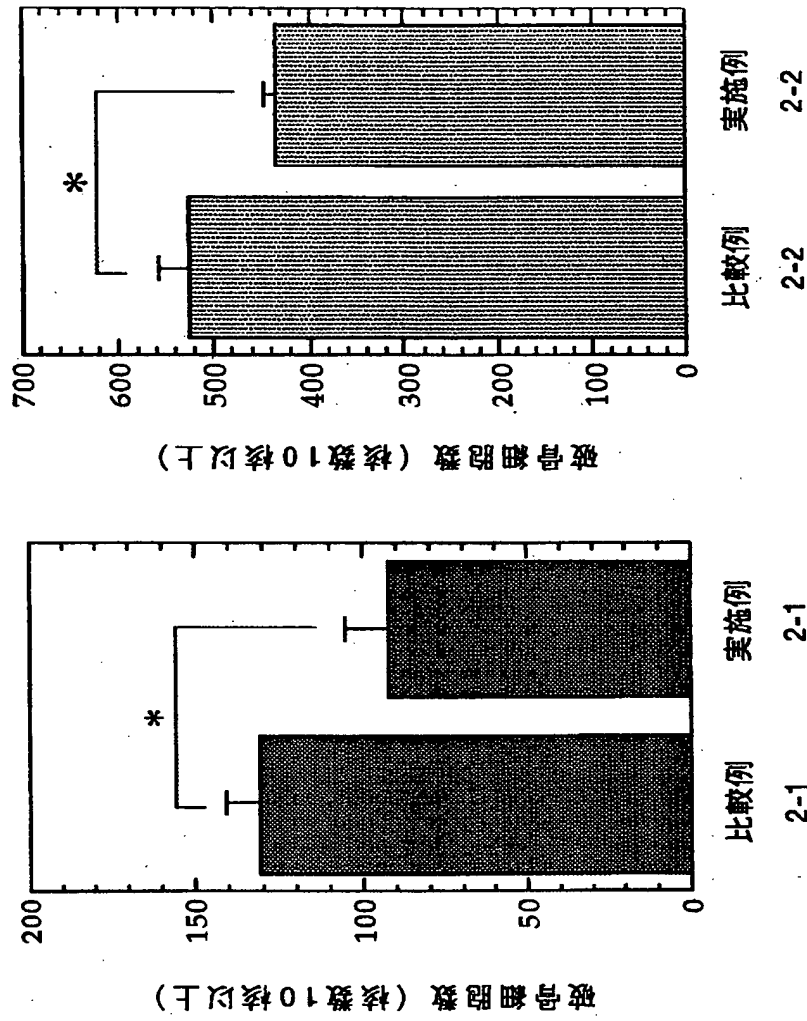


【書類名】 図面

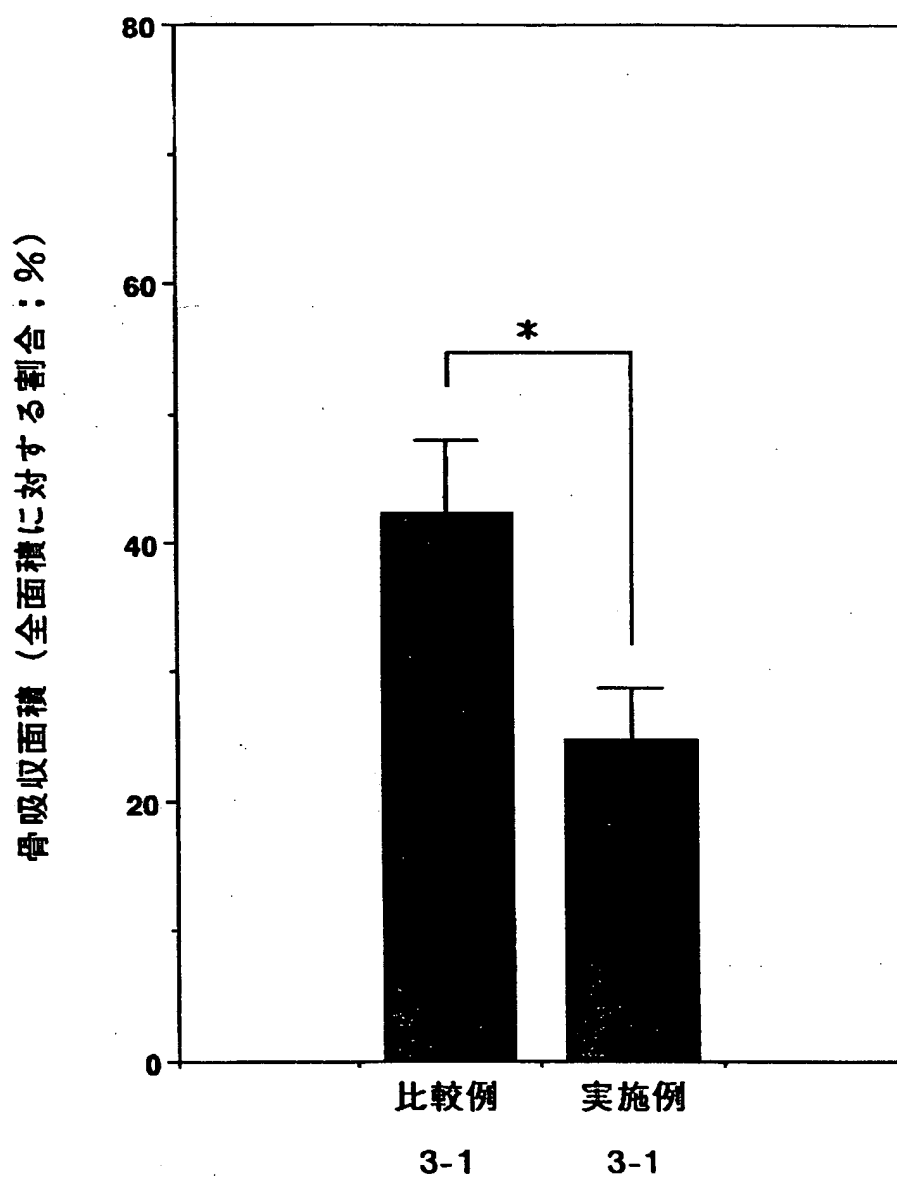
【図 1】



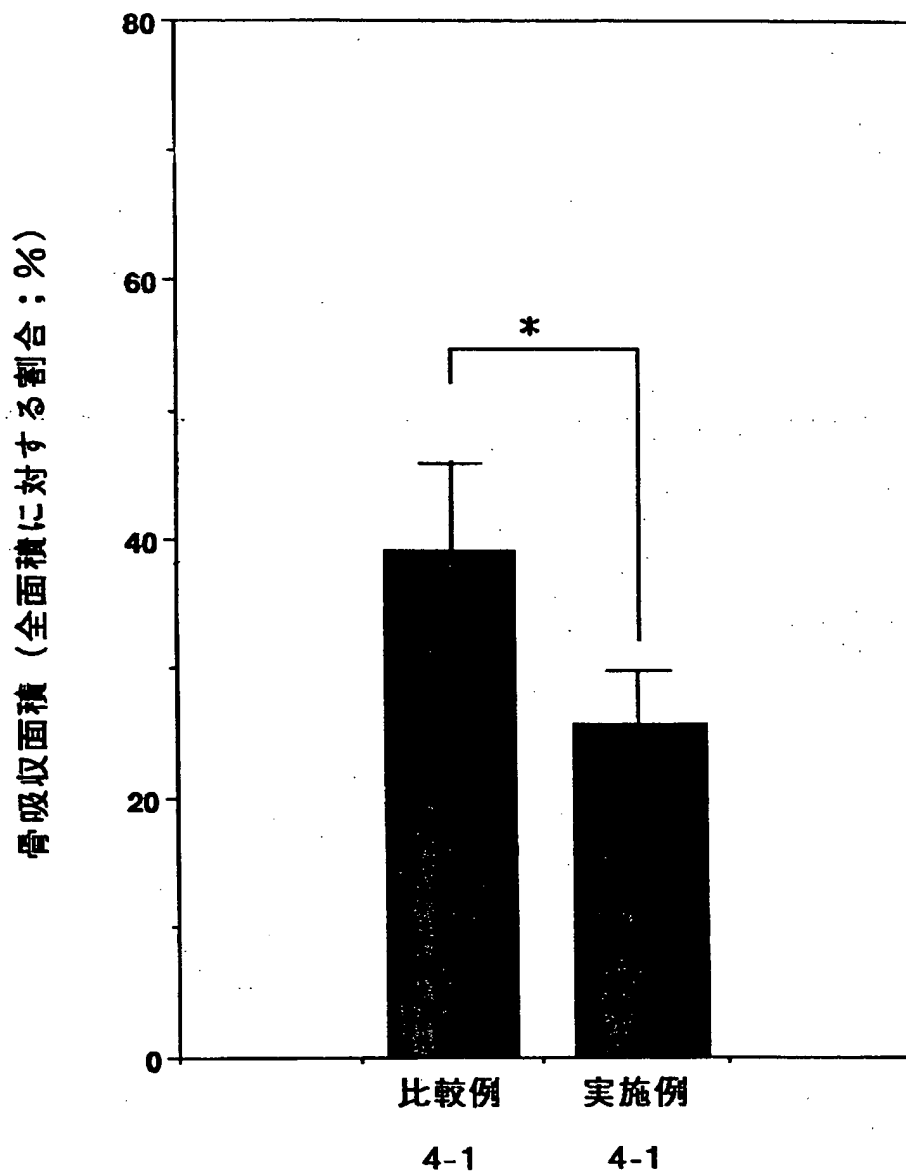
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 副作用の危険性が低い物理的・非侵襲的な超音波刺激による破骨細胞形成抑制方法または骨吸収抑制方法を提供することである。

【解決手段】 培養液中に破骨細胞前駆細胞と誘導因子類とを含む培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法、または培養液中に破骨細胞前駆細胞を含む共存培養系において、超音波を照射することを特徴とする破骨細胞形成抑制方法もしくは骨吸収抑制方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号                    [000003001]

1. 変更年月日            1990年 8月28日

  [変更理由]            新規登録

    住 所            大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

    氏 名            帝人株式会社